

ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Piper aduncum* Y *Piper hispidum* (PIPERACEAE)

CINDY PAOLA GUZMÁN GUTIÉRREZ

WENDY MARCELA MEZA BORNACHERA

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTA MARTA–COLOMBIA
2013**

**ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
CRUDOS DE *Piper aduncum* Y *Piper hispidum* (PIPERACEAE)**

CINDY PAOLA GUZMÁN GUTIÉRREZ

WENDY MARCELA MEZA BORNACHERA

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

WILLINTON ANDRES BARRANCO PÉREZ

Biólogo, Mg. en Bosques y Conservación Ambiental

CODIRECTOR

LUIS FERNANDO ECHEVERRI LÓPEZ

PhD en Química Orgánica

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

SANTA MARTA-COLOMBIA

2013

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director de Programa

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

*A **DIOS**, quien nos ha permitido el milagro de la vida y nos inspira día a día.*

*A **NUESTROS PADRES,**
DANILO GUZMÁN y ASTRID GUTIÉRREZ
VICENTE MEZA y AMARILIS BORNACHERA
Por ser el motor que nos impulsó a seguir adelante y culminar éste importante
proceso que es un gran paso en nuestras vidas.*

*A **NUESTRAS FAMILIAS y AMIGOS.***

*A **TODOS AQUELLOS INTERESADOS EN EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS.***

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales (QOPN) de la Universidad de Antioquia por la colaboración prestada para la elaboración de las pruebas fitoquímicas realizadas en el presente trabajo, en especial a los Doctores Luis Fernando Echeverry y Wiston Quiñonez y al estudiante de maestría Sergio Granados,

Al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) por brindar facilidades para la realización de las pruebas de citotoxicidad y la oportunidad de trabajar con uno de sus colaboradores, el Biólogo David Jurado Tobón quien ofreció guía en este proceso.

Al Laboratorio de Infecciones y Cáncer de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquía (U de A) que está a cargo de la Bacterióloga Aracelis Villegas, por facilitarnos los microorganismos con los cuales se realizaron los ensayos y por el préstamo de sus instalaciones.

A nuestro director de tesis Willinton Barranco Pérez, por darnos la oportunidad de hacer parte de éste proyecto.

Al Herbario UTM C de La Universidad del Magdalena, a su director Docente Eduino Carbonó y al biólogo Héctor García.

A nuestro compañero, amigo y colega Peluffo-DRP, Por guiarnos de principio a fin en éste camino.

Agradecimiento especial a La Universidad del Magdalena y a todas y cada una de las personas que de una u otra forma nos apoyaron en este proceso: Muchas gracias por ayudarnos a crecer como personas y como futuras profesionales.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	12
2. Planteamiento del Problema.....	13
3. Antecedentes.....	14
4. Marco Teorico.....	19
5. Justificación.....	21
6. Objetivos.....	22
6.1. General.....	22
6.2. Específicos.....	22
7. Hipótesis de Trabajo.....	23
8. Metodologia.....	24
8.1. Fase de Campo.....	24
8.2. Fase de Laboratorio.....	24
8.2.1. <i>Preparación de los Extractos</i>	24
8.3. Identificación de Moléculas Bioactivas.....	25
8.3.1. <i>Columna de Sephadex, Perfil de Cromatografía de Capa Fina y RMN</i>	25
8.4. Evaluación Biológica.....	25
8.4.1. <i>Microorganismos</i>	25
8.4.2. <i>Actividad Antimicrobiana</i>	26
8.5. Actividad Citotóxica del Extracto de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i>	26
9. Resultados.....	28

9.1. Perfil de Cromatografía.....	28
9.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	30
9.3. Actividad Antimicrobiana	34
9.4. Actividad Citotóxica del Extracto de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i>	41
10. Discusión	43
11. Conclusiones.....	46
12. Recomendaciones.....	47
13. Bibliografía.....	48
14. Anexos	54

LISTAS DE IMÁGENES

- Imagen 1.** Cromatografía realizada a las primeras fracciones de *Piper hispidum*.....28
- Imagen 2.** Cromatografía de las fracciones iniciales de *Piper aduncum*.29
- Imagen 3.** Cromatografía realizada a las cinco fracciones resultantes de *Piper hispidum*, después de haber juntado las fracciones iniciales por componente cromatográfico.29
- Imagen 4.** Fracciones finales de *Piper aduncum* después de haber unido las demás fracciones por perfil cromatográfico.30
- Imagen 5.** Placas de 96 pozos: A) Plato con el medio y el inóculo de las cepas sin Resazurin. B) Plato con medio e inóculo y el Resazurin como indicador de crecimiento celular.37
- Imagen 6.** Ensayos realizados con *E. coli*: A) *Piper aduncum*, B) *Piper hispidum*.38
- Imagen 7.** Repiques de algunas fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* que se realizaron con el fin de corroborar si había algún efecto inhibitorio frente a *Escherichia coli*. 38
- Imagen 8.** Ensayos realizados con *S. aureus*: A) Se observa el efecto que ejerce *Piper aduncum*. B) Como actúa *Piper hispidum* frente a ésta Bacteria.....39
- Imagen 9.** Ensayos realizados con la Bacteria *Pseudomona aeruginosa*: A) Se observa el efecto que ejerce *Piper aduncum*, B) *Piper hispidum* frente a *Pseudomona aeruginosa*.39
- Imagen 10.** Las tres fotografías muestran la actividad de las nueve fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* evaluadas frente a *Candida albicans*.....40
- Imagen 11.** Repique realizados a las cuatro primeras concentraciones de la fracción uno de *Piper hispidum* frente a *Candida albicans* en donde no se podía observar a simple vista el efecto del Resazurin, se Puede observar que las dos primeras concentraciones inhibieron el crecimiento fúngico de *Candida albicans* mientras en las concentraciones tres y cuatro creció la Levadura.40
- Imagen 12.** Repiques realizados a las fracciones uno, dos y tres de *Piper aduncum* frente a *Candida albicans* para observar el efecto causado por las cuatro primeras concentraciones debido a que el efecto no se pudo notar con el Resazurin.41

LISTA DE FIGURAS

Grafica 1. RMN realizada al extracto sin fraccionar de *Piper aduncum* en donde se observa que hay presencia de anillos aromáticos debido a la presencia de picos 7-8 ppm, grupos metilos que van de 0,5-1,5 ppm, metoxi 3-4 ppm y metileno 1-2,5 ppm.....31

Grafica 2. RMN de la fracción dos de *Piper aduncum*, donde se nota la posible presencia de los grupos metileno 1-2,5 ppm, metoxi 3-4 ppm y anillos aromáticos 7-8 ppm.....32

Grafica 3. Fracción dos de *Piper hispidum* donde se ve la presencia de ácidos carboxílicos 8,9-11 ppm, grupos arilico 6,5-8,5 ppm, grupo metileno 1-2,5 ppm y metoxi 3-4 ppm.....33

Grafica 4. Fracción cinco de *Piper hispidum*, se observan grupos metilos 0,5-1,5 ppm, anillos aromáticos 7-8 ppm y grupos arilos 6,5- 8,5 ppm.34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los bioensayos con <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 2. Microdiluciones realizadas a las fracciones de las especies de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i> contra <i>Staphylococcus. aureus</i>	35
Tabla 3. Fracciones de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i> frente a <i>Pseudomona aureginosa</i>	36
Tabla 4. Fracciones de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i> frente a la levadura <i>Candida albicans</i>	37
Tabla 5. Prueba de citotoxicidad realizada a las fracciones de <i>Piper aduncum</i> y <i>Piper hispidum</i>	42

ANEXOS

Anexo 1. Equipo de Soxhlet al cual fueron sometidas las muestras de plantas durante ocho horas.....	54
Anexo 2. Proceso de percolación en el que se sometieron las muestras secas y molidas de las especies de <i>Piper hispidum</i> y de <i>Piper aduncum</i> durante 48 horas Cada una.	55
Anexo 3. Fotografía del Rota-evaporador en el cual se extraía el solvente de cada uno de los extractos después de cada proceso.	56
Anexo 4. Embudo de separación en el cual se le realizo el lavado de las muestras con acetato de etilo para extraer metabolitos presentes.	57
Anexo 5. Columna de Sephadex al que fueron sometidas cada uno de los extractos de acetato de etilo con cada una de las especies de <i>Piper</i> trabajada con el objeto de Separar en fracciones dependiendo de su polaridad.	58
Anexo 6. Imagen del ensayo de citotoxicidad aplicada a los extractos obtenidos de <i>Piper hispidum</i> y <i>Piper aduncum</i>	59
Anexo 7. Fotografía del montaje de extractos para las pruebas de citotoxicidad de <i>Piper hispidum</i> y <i>Piper aduncum</i>	60

1. INTRODUCCIÓN

La riqueza biológica que presenta nuestro país, es muy diversa con respecto a otros, sin embargo el estudio de la flora aún no es completo, y existen vacíos de información fitoquímica de las familias botánicas, que durante siglos se han utilizado de diferentes formas para el bienestar del hombre; debido a la perturbación a la cual están siendo sometidos los ecosistemas naturales se hace prioritario conocer y evaluar la biodiversidad y composición faunística para su conservación y manejo de estos recursos (Calderón 2002).

En varios países se utilizan las plantas de diferente forma, empleándolas como saborizantes de alimentos, carminativos, perfumería y en la medicina, debido a su acción antisépticas, antibacterianas, antimicrobianas y antifúngica (Rivera 2008). A raíz de esto, la medicina tradicional ha tomado gran importancia en todos los países, por lo que la organización Mundial de Salud, reportó que aproximadamente el 80% de los habitantes del mundo cuenta principalmente con la medicina tradicional para combatir enfermedades que atentan contra la vida humana y en particular las causadas por microorganismos como son los hongos y las bacterias (Newman 1999).

La familia Piperácea y en particular el género *Piper* es utilizado como agente antiparasitario, antibacteriano, antimicrobiano y antifúngico (Newman 1999; Rivera 2008 y Flores 2006), con base en lo anterior, éste estudio realizó un análisis Fitoquímico preliminar y evaluación biológica contra un hongo y tres bacterias utilizando extractos crudos de las especies *Piper aduncum* y *Piper hispidum* empleados en la medicina tradicional del departamento del Magdalena.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias y los hongos son los causantes de múltiples afecciones humanas, dentro de estos grandes grupos de infecciosos se encuentra *Escherichia coli*, causante de cistitis o infección urogenital llegando a ocasionar hasta insuficiencia renal en niños, y en mujeres embarazadas, asimismo es el primer agente infeccioso causante de infección nosocomial (Jiménez *et al.* 2002); *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* son causantes de neumonía nosocomial, ocasionando sepsis, además producen: endocarditis, infecciones en la piel, tejidos y huesos (Carreño *et al.* 2006; Ostos *et al.* 2006); *Candida albicans* una levadura capaz de producir infecciones en la piel, en la cavidad oral y en la vagina, entre las afecciones más comunes causadas por este patógeno encontramos la candidiasis oral y vulvovaginal éste último incide en mujeres adultas sexualmente activas afectando del 6 a 13,8% de éstas (Pimentel y Reynolds 2007; Paniagua *et al.* 2010).

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* son los principales causante de infecciones hospitalarias comunes que se combaten realizando tratamientos con antibióticos, como la ampicilina y ciprofloxacina, pero por su utilización masiva se han hecho resistentes a éstos, por lo que se hace necesario la utilización de fármacos más potentes, que no están al alcance de la mayoría de la población por su alto costo, como los derivados de la penicilina, quinolonas y cefalosporinas (Jiménez *et al.* 2002); por esta razón y para enfrentar a estos agentes infecciosos es necesario evaluar lo utilizado en la medicina tradicional y buscar alternativas eficaces y de bajo costo.

El género *Piper* se ha usado frecuentemente con diferentes propósitos por diversas culturas a lo largo de la historia debido a su potencial como antimicrobiano, que le hace muy versátil en el campo aplicativo. Por ello es necesario plantearse el siguiente interrogante: ¿Los metabolitos secundarios de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* poseen actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*?

3. ANTECEDENTES

La familia Piperaceae ha sido objeto de estudios debido a la presencia de metabolitos secundarios entre los que se registran: alcaloides, amidas, pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos etc. y le confiere propiedades terapéuticas que contribuye a mejorar la calidad de vida del hombre (Orjala *et al.* 1994; Danelutte *et al.* 2003 en Palacios *et al.* 2009). Esta familia, ampliamente distribuida en el mundo, tiene principalmente dos grandes géneros *Piper* y *Peperonia*, el primero es el más representativo e importante por sus propiedades farmacológicas, es utilizado para aliviar afecciones como bronquitis, asma, dolores estomacales, infecciones gonocócicas, cólera e infecciones urogenitales etc. (Chitnis *et al.* 2007), por este motivo ha sido objeto de estudios tanto a nivel internacional como nacional posicionando a Colombia como el quinto país Suramericano que más trabaja con plantas medicinales (Pino 2008).

La fitoquímica del Género *Piper* ha sido ampliamente estudiada, tanto por la diversidad de especies dentro de la familia Piperaceae como por la diversidad interespecífica de los metabolitos secundarios encontrados, sin embargo hasta el año 2000, solo el 10% de las especies de éste género habían sido investigadas, encontrando en 112 especies alrededor de 667 compuestos diferentes (190 alcaloides/amidas, 49 lignanos, 70 neolignanos, 97 terpenos, 39 propenilfenoles, 15 esteroides, 18 cavapirona, 17 chalconas/dihidrochalconas, 16 flavonas, seis flavanonas, cuatro piperolidas y 146 que no pertenecen a los grupos comunes de metabolitos secundarios) (Dyler y Palmer 2004).

Palacios *et al.* (2004) Realizaron extracciones de ADN de individuos de 14 familias de plantas colombianas, las cuales sometieron a PCR para detectar metabolitos secundarios, encontrando que la familia *Piperaceae* contiene enzimas que están involucradas en la producción de alcaloides que presentan potencial inhibitorio contra patógenos.

En el Reino Unido, Chitnis *et al.* (2007) realizaron extracciones de los fruto de *Piper cubeba* en Hexano, Diclorometano y Metanol con el fin de saber si esta tiene acción antioxidante y antibacteriana al ser evaluadas contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistente a la ampicilina, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, encontrando que estos extractos mostraron actividad antioxidante, en

cuanto a la acción antibacteriana ninguno de los extractos inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistente a la ampicilina, aunque si inhibieron el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Portet *et al.* (2007) en extractos hechos con Hexano, Cloroformo y Metanol de las hojas de *Piper hostmannianum*, aislaron monoterpenos y flavononas; los extractos de Hexano mostraron actividad antiplasmodial el ante el crecimiento de la cepa FcB1, resistente a la cloroquina, de *Plasmodium falciparum* , con una CL₅₀ de 8 µg/mL.

En el Perú, Ruiz y Roque (2009) realizaron análisis fitoquímico de cuatro especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional de dicho país, haciendo tres tipos de extracciones: En metanol, etanol e hidro-alcohólica, las cuales fueron evaluadas contra las bacterias: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y los hongos: *Candida albicans*, *Microsporum canis* y *Aspergillus niger*, obteniendo que todos los extractos utilizados inhibieron todas la cepas bacterianas y fúngicas excepto a *Aspergillus niger* que no fue inhibido por ninguno de los extractos obtenidos de las especies vegetales utilizadas en este estudio.

Palacios *et al.* (2009) evaluaron a *Piper tuberculatum* (inflorescencias, hojas y tallos) haciendo extracciones con Diclorometano:Metanol, Etanol y decocción, utilizándolas en varias concentraciones (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg/mL) y enfrentando cada uno de los extractos contra cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* observándose que todos los extractos hechos con Diclorometano:Metanol y Etanol inhibieron el 100% de los hongos en todas las concentraciones evaluadas, exceptuando los extractos de tallos realizados con Etanol, en donde se obtuvo que a concentraciones 0,1 y 0,5 mg/mL la inhibición se encontraba entre el 8% y el 20%; en cuanto a la decocción con las primeras concentraciones (0,1 y 0,5 mg/mL) se obtuvo entre 5% y 30% de inhibición en los extractos de hojas y tallos, y los extractos de inflorescencias arrojaron un 100% de inhibición contra de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*.

Parra *et al.* (2011) evaluaron un nuevo Cromeno y ocho compuestos más aislados de *Piper* cf. *Cumanense* Kunth, el cromeno fue identificado mediante análisis espectroscópico, y encontraron que tenía actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y

Botrytis cinérea.

Ruddock *et al.* (2011) Evaluó extracto MEOH de hojas de *Piper lanceaefolium* Frente a varias cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (causante de infecciones gonocócica) resistente a los antibióticos y observaron que dichos extractos inhibieron el crecimiento de las diferentes cepas de *Neisseria* evaluadas.

En cuanto a las especies de interés en el presente estudio se han realizado trabajos como el elaborado por Baldoqui *et al.* (1999) en el cual de las hojas de *Piper aduncum*, aislaron metabolitos secundarios como Neridol y dos nuevos ácidos benzoicos, obteniendo actividad antifúngica (*Saccharomyces cerevisiae*) con algunos de estos compuestos.

Lemos *et al.* (2000) obtuvieron extractos de las inflorescencias y las hojas de *Piper aduncum* con Cloroformo y Acetato de Etilo, encontrando actividad bactericida de los productos de Cloroformo contra *Staphylococcus aureus*, y ninguna actividad por parte de los extractos de Acetato de Etilo contra esta misma bacteria.

Navickiene *et al.* (2000) aislaron amidas (propenoyl, pyrrolidine y piperamina) de 24 fracciones de *Piper hispidum* y *Piper tuberculatum*, extraídas con diclorometano y hallaron actividad antifúngica frente a *Cladosporium sphaerospermum*.

Rali *et al.* (2007) realizaron hidrodestilación de las hojas de *Piper aduncum* y de los frutos de *Piper glibbilimum*, y aislaron mediante el método Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS) dilapiol, -cariofileno, piperitiona, -humuleno, como parte de un estudio para hallar constituyentes químicos volátiles.

Pino (2008) realizó un estudio para ver el efecto inhibitorio que presentan seis especies de *Piper* (*Piper tricuspes*, *Piper hispidum*, *Piper gorgonillense*, *Piper multiplinervium*, *Piper tuberculatum* y *Piper peltatum*) y la evaluó contra seis cepas bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella tiphy* y *Klebsiella pneumoniae*), en el cual obtuvo como resultados que los extractos de etanol de todas las especies de plantas inhiben el crecimiento las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* cuando está en una concentración de 40mg/mL a

excepción de los extractos etanolicos de *P. multiplinervium* el cual no mostro actividad.

Plazas *et al.* (2008) extrajeron de las inflorescencias de *Piper hispidum* flavononas y derivados acetilenos los cuales fueron obtenidos colocando las muestras en etanol al 96% para luego correr los extractos concentrados en una columna de sílica gel, en éste proceso se obtuvieron flavonoides como 5-hidroxi-7-metoxiflavanona, (el cual solo se ha aislado en *Piper hispidum* y *Piper aduncum*); y 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona (reportada por Primera vez para el género *Piper*); posteriormente se comprobó la citotoxicidad de las flavonas obtenidas frente *Artemia salina* (Crustáceo) y se encontró que 5-hidroxi-7-metoxiflavanona es el más tóxico para el crustáceo a una concentración de 1,8 µg/mL.

Guerrini *et al.* (2009) por hidrodestilación de hojas de *Piper aduncum* aislaron dilapiol el cual representó un 45% y Safrol en un 45% para *Piper obliquum*, con estos compuestos realizaron ensayos contra hongos fitopatógenos y dermatofitos.

Castro *et al.* (2009) encontraron actividad acaricida contra *Rhipirethalus (Bouphilus) microplus*, de compuestos extraídos de las hojas de *Piper aduncum* con hexano, acetato de etilo y etanol e identificaron dilapioles y Fenilpropanoides.

En un estudio realizado en Cuba, de las hojas *Piper aduncum* y *Piper hostmannianum* se extrajeron compuestos derivados del ácido benzoico prenilado y se halló que los componentes aislados de estas especies presentan actividad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum* (Lago *et al.* 2009).

Estudios realizados por Flores *et al.* (2009) encontraron derivados de ácido benzoico prenilados (tres nuevos ácidos hidrobenczoicos prenilados y ácidos benzoicos conocidos) extraídos por diclorometano de hojas de *Piper aduncum* y *Piper heterophyllum*, algunos de éstos ácidos nuevos presentaron actividad antiparasitaria.

Morandim *et al.* (2010) encontraron que los aceites esenciales de *Piper aduncum* obtenidos por hidrodestilación presentan actividad antifúngica ante *Candida albicans* (>250 µg/mL) en tales aceites encontraron 14 monoterpenos y 55 sesquiterpenos.

Ruiz *et al.* (2011) aislaron una amida nueva, dos chalconas conocidas y una flavonona conocida, extraídas con etanol de las hojas de *Piper hispidum* y reportaron su actividad antileishmanial.

En Cuba, Pino *et al.* (2011) realizaron una caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente *Varroa destructor* principal plaga para las colmenas de abejas; obteniendo que los principales constituyentes del aceite esencial de esta especie de plantas son Piperitona, Alcanfor, Canfeno y Viridiflorol, la actividad acaricida demostró que con una dosis de 25 µL de estos compuestos se causa la muerte de los ácaros y la sobrevivencia de las abejas aumenta.

Araújo *et al.* (2012) por medio de la hidrodestilación de las hojas de *Piper aduncum* se aislaron Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanoides ((E)-nerdidol, 1-humulemo, -cariofileno), siendo estudiados para determinar la actividad acaricida contra *Tetranychus urticae*.

Potzernheim *et al.* (2012) caracterizaron los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las hojas de cuatro poblaciones diferentes de *Piper aduncum*, en los cuales hallaron 4-terpineol y piperitona.

En Colombia, se realizó un estudio donde se evaluó la actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de hojas y tallos de cinco especies de *Piper* entre ellas *Piper aduncum*, *Piper auritum*, *Piper jericoense*, *Piper marginatum* y *Piper obrutum*, una marcha química indicó presencia de flavononas en *Piper aduncum*, *Piper auritum* y *Piper obrutum*, y terpenos o esteroides en todas las especies ensayadas y poca presencia de alcaloides en todas las especies excepto en *Piper marginatum*, algunos compuestos fueron aislados como es el caso de aduncumina, broneol, y pinostrobin los cuales fueron obtenidos de *Piper aduncum*, en cuanto a la actividad antiplasmodial cuatro de los extractos de las especies *Piper* fueron no activos, cuatro moderadamente activos, dos activos y ninguno altamente activo, por otro lado el análisis de citototoxicidad mostro un extracto altamente toxico, cinco citotóxicos y dos moderadamente citotóxica (Mesa *et al.* 2012).

4. MARCO TEORICO

La vida del hombre ha estado ligada a las plantas, siendo éstas una fuente de alimentos, vestidos e implementos que de una u otra forma brindan bienestar físico y social, además de la utilización de estas como productos naturales para aliviar afecciones o enfermedades producidas por agentes patógenos (bacterias, hongos, virus o parásitos); la historia de las plantas data de siglos antes de Cristo (Newman et al. 2003) La medicina tradicional ha tomado gran importancia alrededor del mundo, por lo que la organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que aproximadamente el 80% de los habitantes del mundo cuentan principalmente con la medicina tradicional para el cuidado de la salud (Newman 1999). La región Caribe Colombiana no ha sido ajena al uso de estos recursos y al desarrollo de conocimientos en medicina tradicional; En la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) y sus alrededores, dos grupos importantes de conocedores o médicos tradicionales: los Mamos de las comunidades indígenas Arahua, Kogui y Wiwa, y los curanderos de los pueblos de las tierras bajas del Magdalena Grande en Cesar, La Guajira y Magdalena, hacen uso desde hace siglos de técnicas tradicionales para afrontar enfermedades y otras afecciones debido a las limitantes que tienen al vivir en zonas rurales en las cuales no hay cobertura hospitalaria adecuada ni suficiente (Barranco 2011).

Las especies vegetales presentan potencialidad para la farmaconogcia, por esto se han realizado múltiples investigaciones para la identificación de metabolitos secundarios y aceites esenciales (Walton *et al.* 1999 en Palacios *et al.* 2004) en diferentes especies de familias botánicas entre ellas incluidas la familia Piperaceae la cual es, en Colombia, una de las más conocidas y utilizadas por diferentes culturas para aliviar afecciones que aquejan nuestra sociedad donde las más afectados son poblaciones establecidas en el área rural (Barranco 2011).

La familia Piperaceae es originaria del sudoeste de la India siendo una de las más antiguas (Plazas 2008) comprende diez géneros de distribución pantropical (Rivera 2008). Los géneros más importantes son: *Piper*, con aproximadamente 3.200 especies (Mesa 2012) y *Peperonia*, con más de 700 especies (Flores 2006). El género *Piper* se caracteriza por ser herbáceas, arbustos y raras veces arboles pequeños, presentan una amplia variedad de hábitats y se caracteriza por liberar aromas al ser estrujados (Rivera 2008). Tienen

importancia económica a nivel mundial y las especies más conocidas son *Piper nigrum*, de la cual se extrae la pimienta blanca (Flores 2006 y Mesa 2012) y *P. methysticum*, conocida comúnmente como “Kava Kava” es utilizadas en rituales de algunas culturas del océano pacífico y Polinesia etc. (Mesa 2012) y se dice que posee efecto narcótico (Plazas *et al.* 2008).

El género *Piper* tiene un gran uso para tratar diversas afecciones como la malaria, neumonía, bronquitis anemia asma, diabetes, cólera, enfermedades gonocócicas etc. (Mesa 2012). En Colombia se conoce popularmente este género como cordoncillo o aníes y dentro de sus constituyentes químicos están ácidos benzoicos, prenilado, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, kavalactonas, epóxidos y alcaloides (Mesa 2012 y Plazas *et al.* 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

La diversidad florística colombiana es una fuente importante para el estudio y aprovechamiento del metabolismo secundario, en nuestro país existen herramientas potenciales que podrían combatir enfermedades o tener diversidad de usos que no son aprovechadas y que se encuentran en peligro de extinción debido a la deforestación, la contaminación y demás perturbaciones que la actividad humana acarrea sobre los recursos naturales.

El primer paso para el aprovechamiento de los metabolitos secundarios de las plantas es la caracterización del tipo de actividad, seguido de la identificación de los principios activos, su aislamiento y posterior implementación en el campo al que corresponda (Farmacéutica, Industria, Estética, etc.)

El ser humano se ha visto afectado durante milenios por múltiples enfermedades en las que en ocasiones se ve comprometida su vida, la mayoría de éstas, causadas por microorganismos (usualmente bacterias u hongos), de las cuales muchas llegan a ser casos clínicos; debido al uso indiscriminado de antibióticos, estos microorganismos han generado resistencia que les permiten tolerar el efecto de dichos medicamentos, por lo que es necesario buscar alternativas eficaces, que permitan garantizar una mejor calidad de vida a los pacientes, y quizá éstas alternativas se encuentren en las plantas o derivados de estas, que han sido la fuente utilizada por muchas culturas durante siglos; de acuerdo a lo anterior, un análisis de los metabolitos secundarios de las especies *Piper aduncum* y *Piper hispidum*, (plantas utilizadas ampliamente para aliviar infecciones cutáneas, dolores estomacales, cistitis etc.) y su posterior evaluación biológica contra patógenos humanos, sería un aporte para la medicina ya que propende generar nuevos antibióticos, los cuales al ser implementados podrían reducir la morbilidad y mortalidad que se han presentado en la población mundial a causa de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, los cuales serán utilizados en el presente estudio.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Efectuar un estudio fitoquímico preliminar y la actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, de los extractos crudos de las especies *Piper aduncum* y *Piper hispidum* (Piperaceae), utilizadas en la medicina tradicional de la Sierra Nevada de Santa Marta.

6.2. Específicos

- Obtener extractos crudos de diferente polaridad de las especies *Piper aduncum* y *Piper hispidum* (Piperaceae), utilizadas en la medicina tradicional de la Sierra Nevada de Santa Marta.
- Efectuar perfiles cromatográficos y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los extractos obtenidos, para detectar la presencia de metabolitos.
- Realizar bioensayos *in vitro* para determinar el potencial de inhibición de los metabolitos secundarios contra cepas microbianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

7. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los extractos crudos de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* (Piperaceae), presentan actividad inhibitoria contra cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y cepas fúngicas de *Candida albicans*.

8. METODOLOGIA

8.1. Fase de Campo

Se tomaron aproximadamente 3.000 gramos en peso húmedo de planta de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* (Piperaceae) que comprende (hojas, corteza y frutos). En la hacienda La Victoria, ubicada entre los 600 y los 1.400 msnm (Cuadrado 2005) en la cuenca media del río Gaira, Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM). Los ejemplares fueron determinados taxonómicamente en el herbario de la Universidad del Magdalena (UTMC) por el MSc Eduino Carbone, y se registraron e ingresaron a la colección del herbario UTMC de la Universidad del Magdalena.

8.2. Fase de Laboratorio

8.2.1. Preparación de Los Extractos

Las muestras vegetales fueron secadas a temperatura ambiente durante 15 días, y posteriormente molidas, las muestras fueron llevadas a un equipo de Soxhlet (Ver Anexo 1), donde se utilizaron 2,5 L de Hexano al 95%, con 338,6 g de *Piper aduncum* y 527,8 g de *Piper hispidum*, este procedimiento se realizó durante 8 horas para cada una de las especies de *Piper*. Luego Las muestras fueron secadas en una campana de extracción y se sometieron a una percolación con Metanol al 95% a un volumen 1,8 L durante 48 horas cada una (Ver Anexo 2). Lo obtenido se concentró en un rota-evaporador (Ver Anexo 3), luego se llevó a un embudo de separación y se le agregaron 250 mL de Hexano, este procedimiento se realizó dos veces, con el objeto de extraer clorofilas y grasas (Ver Anexo 4). Finalizado este procedimiento, a la muestra inicial se le realizó la misma operación con acetato de etilo con el objetivo de extraer todo lo que era soluble en este solvente, el cual fue el objetivo de mayor interés para la realización de las pruebas biológica del presente estudio, cada uno de los extractos obtenidos en Hexano y acetato de etilo fueron concentrados en un rota-evaporador.

8.3. Identificación de Moléculas Bioactivas

8.3.1. Columna de Sephadex, Perfil de Cromatografía de Capa Fina Y RMN

Las muestras extraídas con acetato de etilo al 95% fueron llevadas a una columna de Sephadex (Ver Anexo 5) con el objeto de fraccionarlas y purificarlas, para lo cual fue necesario la utilización de mezcla triple 2:1:1 (Hexano 95%, Diclorometano 95% y Metanol 95%) con el objeto de hacer una separación por polaridad de los metabolitos presentes en dicha muestra, se pesaron 800 mg del extracto obtenido del acetato de etilo y se disolvieron en la mínima cantidad de mezcla triple y se filtraron en acrodiscos de 0,45 µm diámetro de poro, durante el proceso de corrido de la columna se fueron recogiendo las fracciones obtenidas por su coloración debido a que estas especies de *Piper* tienen un color fuerte, la última fracción se bajó con metanol debido a que era más polar (Gallego *et al.* 2006). Al finalizar este procedimiento se obtuvieron 9 fracciones en total (5 *Piper hispidum* y 4 *Piper. aduncum*), las cuales fueron concentradas para eliminar el solvente y agua, luego se tomaron pequeñas muestras de esas fracciones para hacer placas de cromatografías, las cuales se colocaron en una cámara cromatográfica adicionándole 1 mL de Hexano y 0,2 mL de acetato de etilo y revelados con un revelador universal para poder elucidar los metabolitos presentes en la muestra.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un Bruker AMX (300 MHz) usando CD_3OD y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se reportan en unidades ppm (Para ello fueron seleccionadas las fracciones de *Piper hispidum* y *Piper aduncum* y la muestra testigo para hacer comparaciones, la preparación se realizó adicionando 600 µL de cloroformo y colocadas en un tubo de resonancia (Michel *et al.* 2010, Guerrini *et al.* 2009).

8.4. Evaluación Biológica

8.4.1. Microorganismos

Las cepas microbianas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25925, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231

las cuales fueron obtenidas del Laboratorio de Infecciones y Cáncer de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquía (U de A).

8.4.2. Actividad Antimicrobiana

Se utilizaron cepas puras en fase logarítmica de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aureginosa* y el hongo (levadura) *Candida albicans*, las cuales fueron proporcionadas y repicadas por el Laboratorio de Infecciones y Cáncer de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquía. Se tomó un inóculo de la bacteria con un hisopo y se suspendió en 5 mL de solución salina tamponada (PBS), hasta obtener el patrón de turbidez propuesto por Mac Farland de 10^5 UFC/mL para determinar la concentración de las bacterias en el medio. Para el análisis se utilizaron platos de 96 pozos, en cada uno se agregaron 160 µL de caldo Muller-Hinton para el caso de bacterias y El medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para la levadura (Becerra *et al.* 2008 y Borroto *et al.* 2011), en la primera fila de pocillos se agregó el doble del medio 320 µL y 40 µL de cada extracto en sus respectivos pocillos, a partir de este volumen se realizaron las diluciones seriadas de 1:8, luego se le adicionaron a cada pozo 20 µL de la solución salina con los microorganismos, y 18 µL de resazurin (el crecimiento microbiano se denota por la reducción de este colorante por el crecimiento celular) (Sarker *et al.* 2007); como control positivo se utilizó la Gentamicina (bacterias) y Anfotericina B (hongo) y como control negativo se usó DMSO. Las placas de bacterias y de hongos se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de este tiempo se hacían las respectivas lecturas observando si había o no crecimiento celular por la coloración rosada del Resazurin, en los pozos en los que a simple vista no se podía observar dicho crecimiento se hicieron repiques para corroborar la presencia o ausencia de actividad, la Concentración mínima Inhibitoria (CMI) se tomó de la concentración menor de cada fracción donde no hubo viraje en la coloración en la que hubo ausencia de actividad antimicrobiana.

8.5. Actividad Citotóxica del Extracto de *Piper aduncum* y *Piper hispidum*

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* se utilizó el método del bromuro 3-(4,5dimetiltiazol-2il)- 2,5-difenil tetrazolio (MTT) el cual consiste en revelar daños de las células en la mitocondria (Mosmann 1983 en Mesa *et al.* 2012), La

prueba se realizó con la línea celular U-937 las cuales fueron mantenidas en cultivos realizados en el laboratorio del Programa de estudio y control de enfermedades tropicales (PECET); las células fueron cultivadas en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero fetal Bobino (SBF) al 10% e incubadas a 37°C y 5% CO₂, haciendo recambio de medio cada 48 horas hasta alcanzar un número adecuado de células para la realización del montaje de los ensayos. Al cabo de 48 horas se tomaron las células y se centrifugaron por 10 minutos a 1.000 RPM, luego fueron contadas en una cámara de Neubauer (Mesa *et al.* 2012).

En una placa de 96 pozos fueron colocadas aproximadamente 4.550.000 células/mL por cada pozo en medio RPMI y suplementado con SBF al 10% y en presencia de cada una de las fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* se evaluaron a siete concentraciones entre 100-1,56 µg/mL y fueron incubadas por 72 horas a 37°C y 5% CO₂ los ensayos se realizaron por duplicado, como control positivo se utilizó la Anfotericina B y como blanco solo se utilizó el medio RPMI suplementado con SBF para observar el comportamiento de las células U-937; pasado este tiempo se tomaron las placas y a cada pozo se le agregó 20 µL de MTT, el cual se dejó actuar durante tres horas para observar la formación de cristales que precipitaron, los cuales fueron disueltos con 100 µL de una solución de parada consistente en 10% SDS y 50% isopropanol (la cual hace que la deshidrogenasa mitocondrial actúe reduciendo el MTT) y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA (BioRad). Los datos obtenidos en los ensayos se analizaron con el programa GraphPadPrism 5 para hallar la concentración tóxica en µg/mL (CI₅₀) mediante un modelo de regresión logística no lineal (Mesa *et al.* 2012, Molina *et al.* 2011).

9. RESULTADOS

9.1. Perfil de Cromatografía

Por medio del método de Sephadex se obtuvieron 23 fracciones de las especies *Piper hispidum* y *Piper aduncum*, Recogiendo y separando por colorimetría 16 fracciones de la especie *Piper hispidum* y siete (7) para la especie *Piper aduncum*. (Ver anexo 3).

Para las 23 fracciones se realizó cromatografía de capa fina para determinar los perfiles cromatográficos de las fracciones y unificar los que se observaron similares, mostraron el mismo perfil cromatográfico. Obteniendo como resultado nueve fracciones, Cinco (5) para los extractos de *Piper hispidum* y cuatro (4) fracciones para los extractos de *Piper aduncum* (ver imágenes 1, 2,3 y 4).

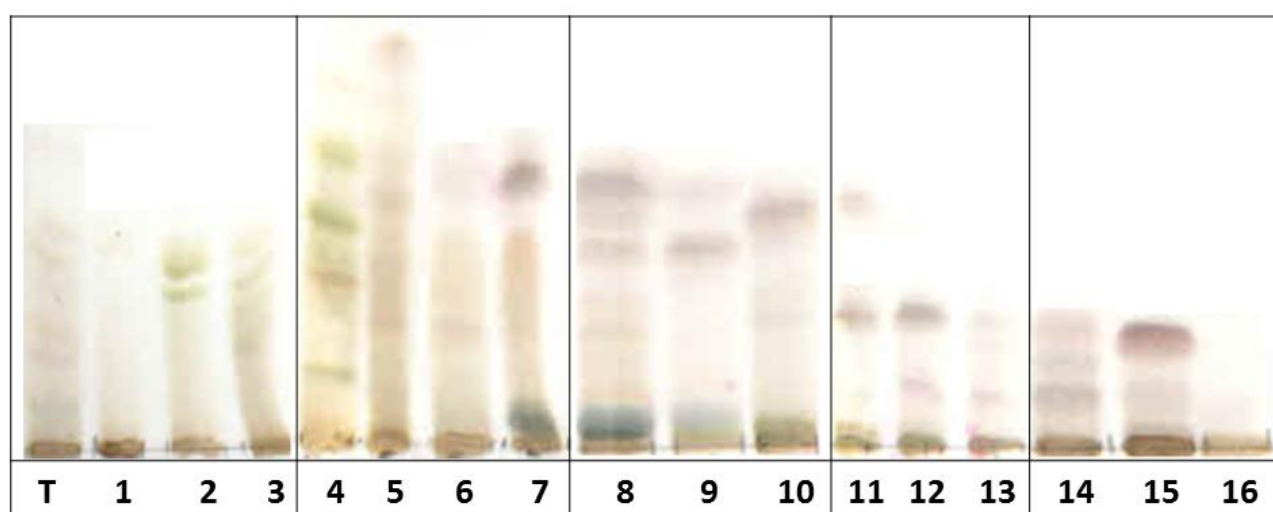


Imagen 1. Cromatografía realizada a las primeras fracciones de *Piper hispidum*.

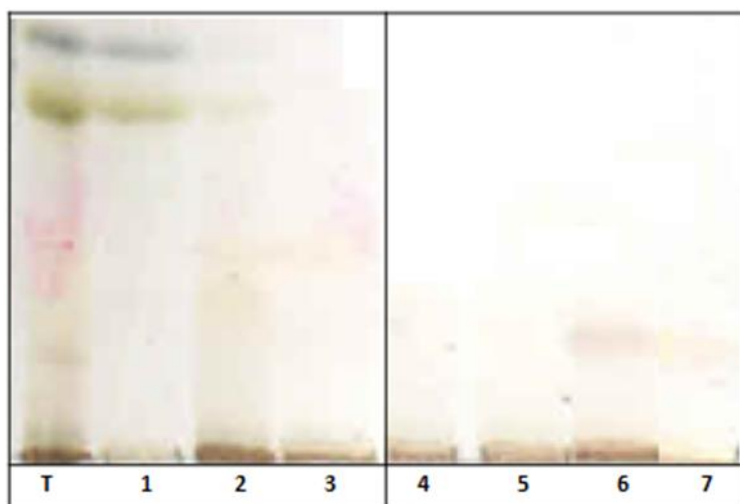


Imagen 2. Cromatografía de las fracciones iniciales de *Piper aduncum*.

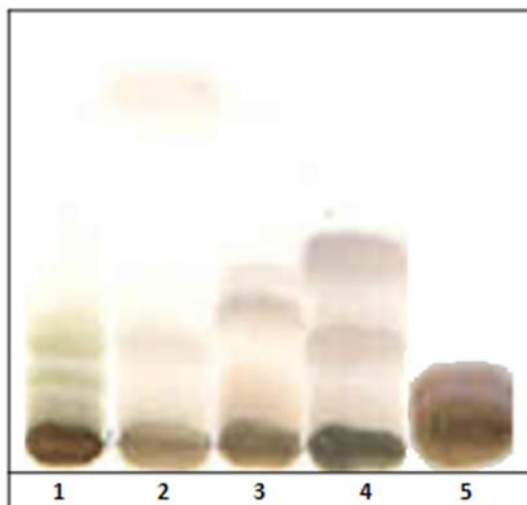


Imagen 3. Cromatografía realizada a las cinco fracciones resultantes de *Piper hispidum*, después de haber juntado las fracciones iniciales por componente cromatográfico.

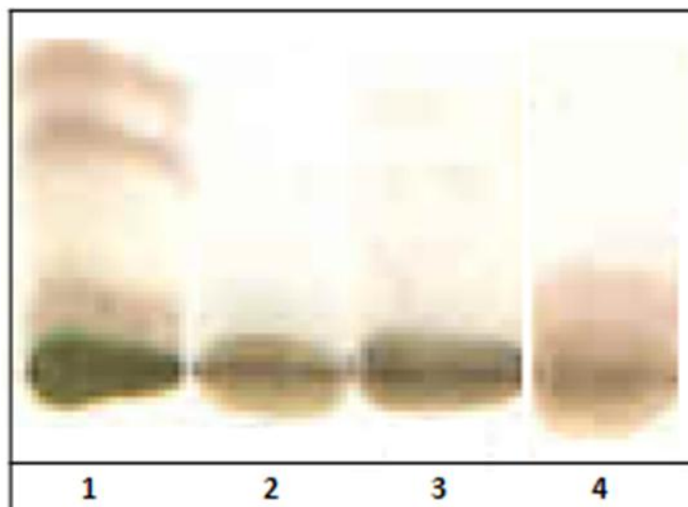
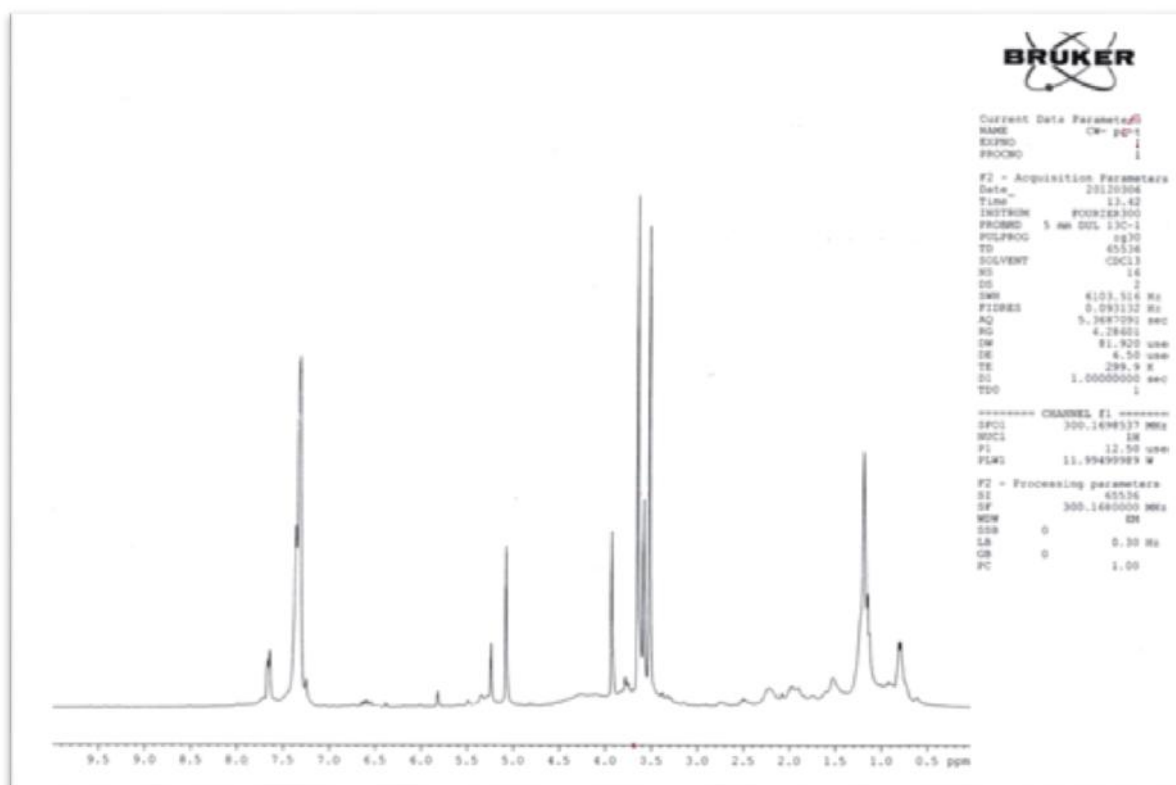


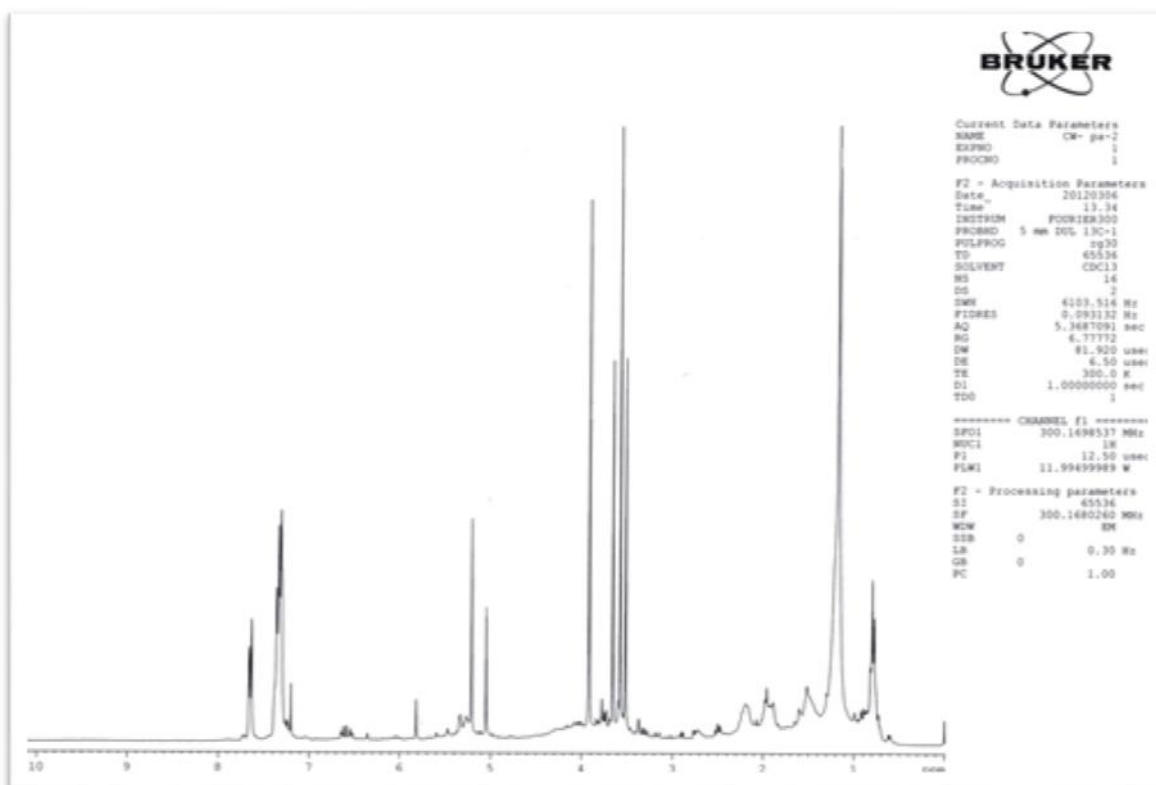
Imagen 4. Fracciones finales de *Piper aduncum* después de haber unido las demás fracciones por perfil cromatográfico.

9.2. Resonancia Magnética Nuclear

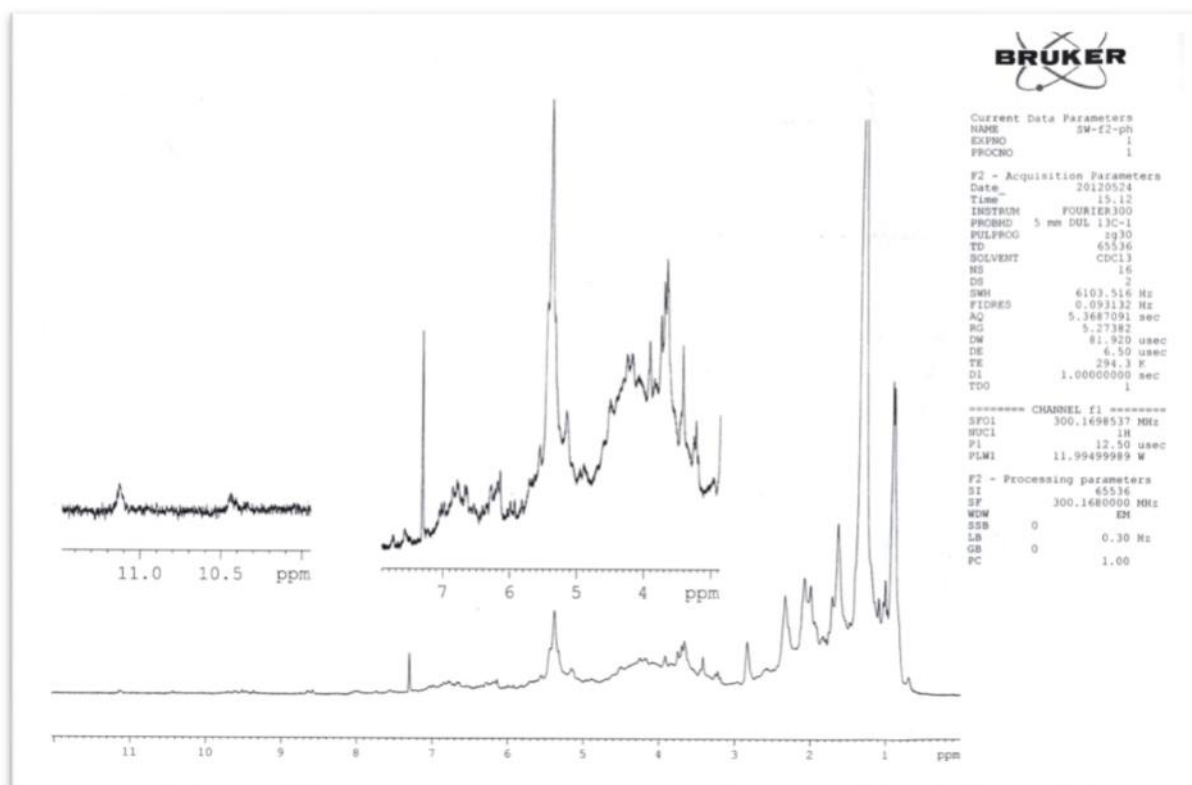
La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) realizadas a las fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* mostró la probable presencia de grupos metileno, metilos, metoxi, anillos aromáticos, además en las fracciones de *Piper hispidum* se registran ácidos carboxílicos, arílicos lo que se puede denotar por la presencia de picos a 1-2,5; 0,5-1,5; 3-4; 7-8; 8,9-11 y 6,5-8,5 ppm respectivamente (Ver figuras 1, 2,3 y 4)



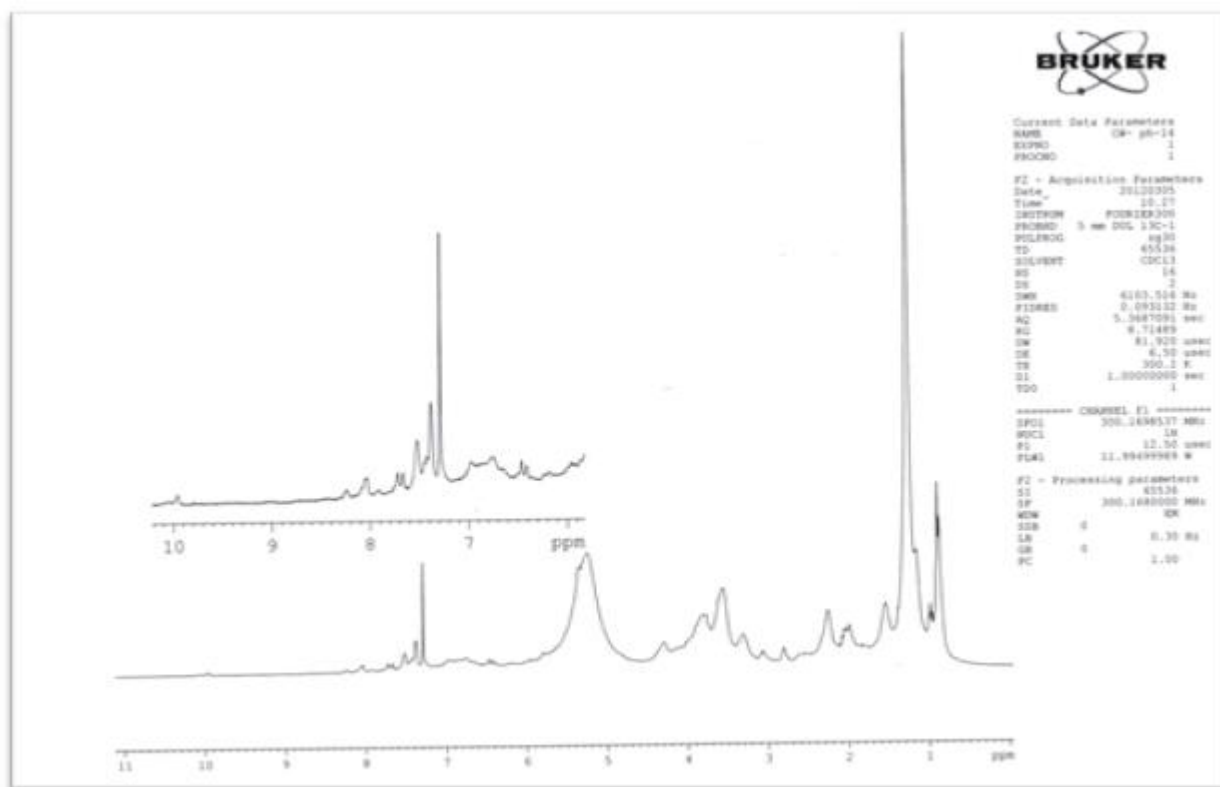
Grafica 1. RMN realizada al extracto sin fraccionar de *Piper aduncum* en donde se observa que hay presencia de anillos aromáticos debido a la presencia de picos 7-8 ppm, grupos metilos que van de 0,5-1,5 ppm, metoxi 3-4 ppm y metileno 1-2,5 ppm.



Grafica 2. RMN de la fracción dos de *Piper aduncum*, donde se nota la posible presencia de los grupos metileno 1-2,5 ppm, metoxi 3-4 ppm y anillos aromáticos 7-8 ppm.



Grafica 3. Fracción dos de *Piper hispidum* donde se ve la presencia de ácidos carboxílicos 8,9-11 ppm, grupos arílico 6,5-8,5ppm, grupo metileno 1-2,5 ppm y metoxi 3-4 ppm.



Grafica 4. Fracción cinco de *Piper hispidum*, se observan grupos metilos 0,5-1,5 ppm, anillos aromáticos 7-8 ppm y grupos arilos 6,5- 8,5 ppm.

9.3. Actividad Antimicrobiana

Las pruebas biológicas en donde se evaluó el potencial inhibitorio que presentaban los extractos de acetato de etilo de las fracciones *Piper aduncum* y *Piper hispidum* en platos de 96 pozos realizando 8 diluciones seriadas en varias concentraciones (5.000; 2.500; 1.250; 625; 312,5; 156,25; 78,125; 39,0625 µg/mL) contra la cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y utilizando como control positivo la Gentamicina (A concentraciones de 1.608; 804,02; 402,01; 201,01; 100,50; 50,251; 25,126; 12,563 µg/mL) arrojaron que las cepas bacterianas ensayadas no fueron inhibidas por ninguna de las 9 fracciones de las especies de *Piper* estudiadas, mientras que la Gentamicina usada como control positivo inhibió el crecimiento de todas las cepas bacterianas en todas las concentraciones evaluadas, efecto que se logró observar gracias al resazurin el cual es un colorante azul o morado que en presencia de crecimiento celular se reduce virando a un color rosado (Ver Tablas del 1al 3 e imágenes del 5 a 9).

Tabla 1. Resultados de los bioensayos con *Piper aduncum* y *Piper hispidum* frente a *Escherichia coli*.

<i>Escherichia Coli</i>									
Fracciones/[μ g/mL	F1Ph	F2Ph	F3Ph	F4Ph	F5Ph	F1Pa	F2Pa	F3Pa	F4Pa
5.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38,063	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Microdiluciones realizadas a las fracciones de las especies de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* contra *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>									
Fracciones/[μ g/mL	F1Ph	F2Ph	F3Ph	F4Ph	F5Ph	F1Pa	F2Pa	F3Pa	F4Pa
5.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38,063	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* frente a *Pseudomona aureginosa*.

<i>Pseudomona aureginosa</i>									
Fracciones/[μ g/mL	F1Ph	F2Ph	F3Ph	F4Ph	F5Ph	F1Pa	F2Pa	F3Pa	F4Pa
5.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38,063	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los ensayos realizados para evaluar las fracciones de acetato de etilo las dos especies de *Piper* frente a *Candida albicans*, arrojaron que tres fracciones de *Piper aduncum* inhibieron el crecimiento de esta levadura, la fracción uno a concentraciones de 5.000 y 2.500 μ g/mL, la fracción dos a concentraciones 5.000, 2.500 y 1.250 μ g/mL, y la fracción tres que fue la que mayor registro de inhibición presentó a 5.000; 2.500; 1.250 y 625 μ g/mL, lo que se pudo comprobar haciendo repiques de estos pozos debido a que no hubo un cambio de color notorio en los extractos, lo mismo sucedió con la fracción uno de *Piper hispidum* quien también inhibió el crecimiento de *Candida albicans* en dos concentraciones (5.000 y 2.500 μ g/mL), por lo cual podríamos decir que algunos extractos de las dos especies de *Piper* evaluadas en este ensayo tuvieron un efecto positivo contra esta levadura obteniendo con la fracción tres de *Piper aduncum* una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 625 μ g/mL, la fracción dos 1.250 μ g/mL mientras que la fracción uno de *Piper aduncum* y uno de *Piper hispidum* tuvieron una CIM de 2.500 μ g/mL; el control positivo utilizado para esta prueba fue la Anfotericina B, la cual fue utilizada en concentraciones de 1.206; 603,02; 301,51; 150,75; 75,38; 37,69; 18,84 y 9,42 μ g/mL y resultó efectiva para la inhibición de *Candida albicans* en todas sus diluciones. La inhibición se pudo observar claramente cuando se hicieron repiques de estos ensayos (Ver Tabla 4 e Imágenes 10, 11 y 12) Todos los ensayos fueron montados por triplicado.

Tabla 4. Fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* frente a la levadura *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>									
Fracciones/[μ g/mL	F1Ph	F2Ph	F3Ph	F4Ph	F5Ph	F1Pa	F2Pa	F3Pa	F4Pa
5.000	+	-	-	-	-	+	+	+	-
2.500	+	-	-	-	-	+	+	+	-
1.250	-	-	-	-	-	-	+	+	-
625	-	-	-	-	-	-	-	+	-
312,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38,063	-	-	-	-	-	-	-	-	-

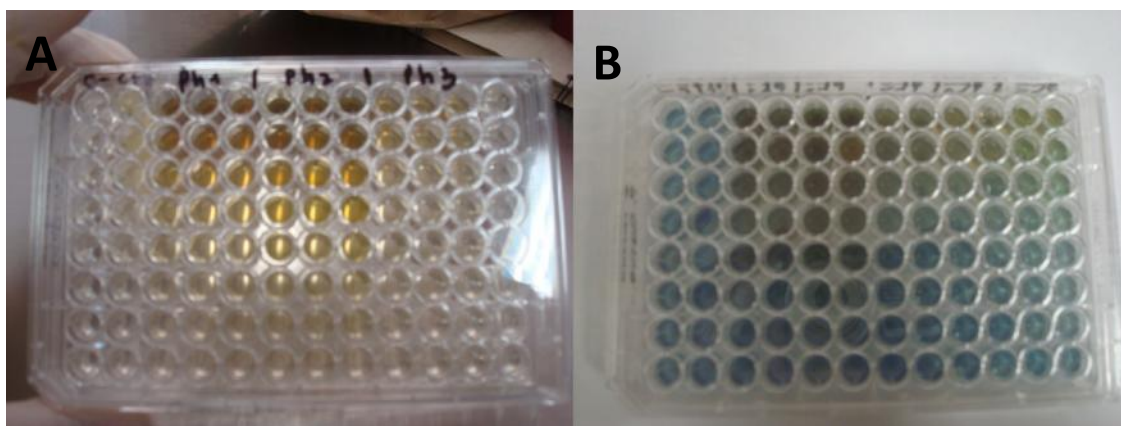


Imagen 5. Placas de 96 pozos: A) Plato con el medio y el inculo de las cepas sin Resazurin. B) Plato con medio e inculo y el Resazurin como indicador de crecimiento celular.

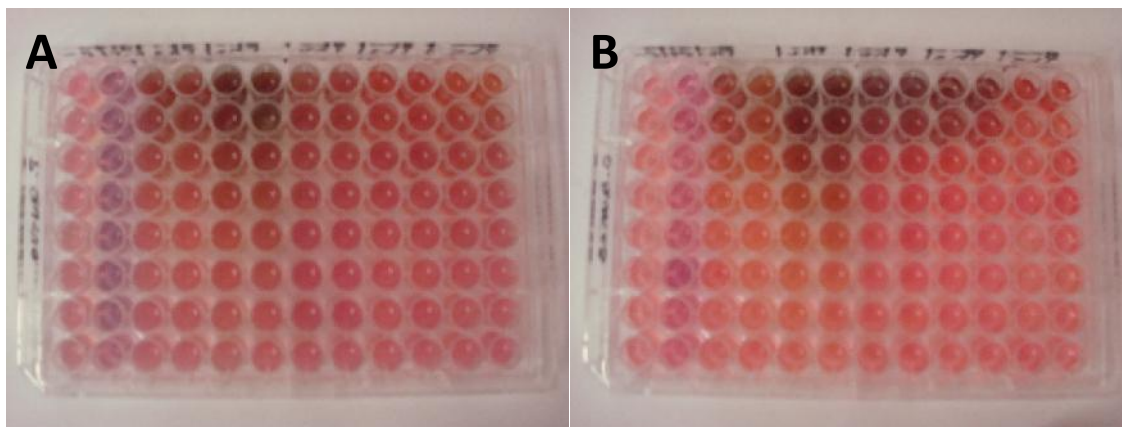


Imagen 6. Ensayos realizados con *Escherichia coli*: A) *Piper aduncum*, B) *Piper hispidum*.

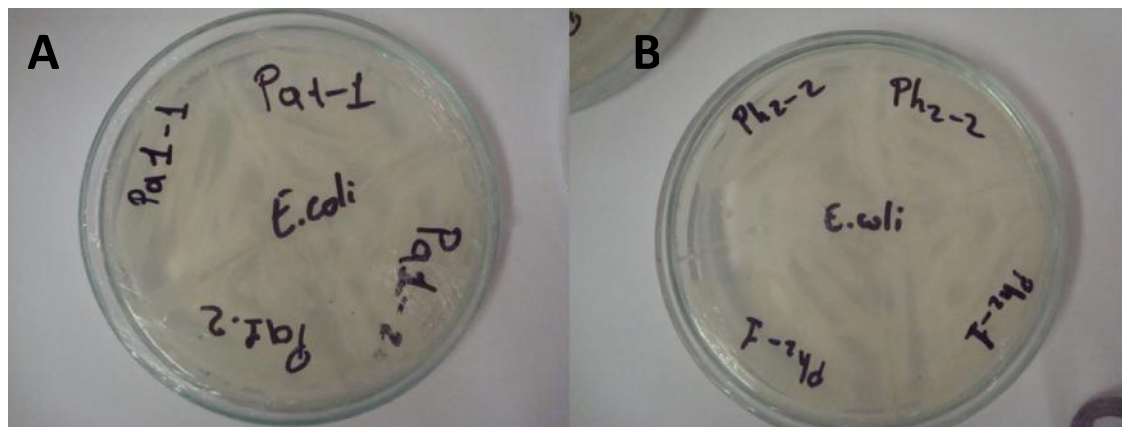


Imagen 7. Repiques de algunas fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* que se realizaron con el fin de corroborar si había algún efecto inhibitorio frente a *Escherichia coli*.

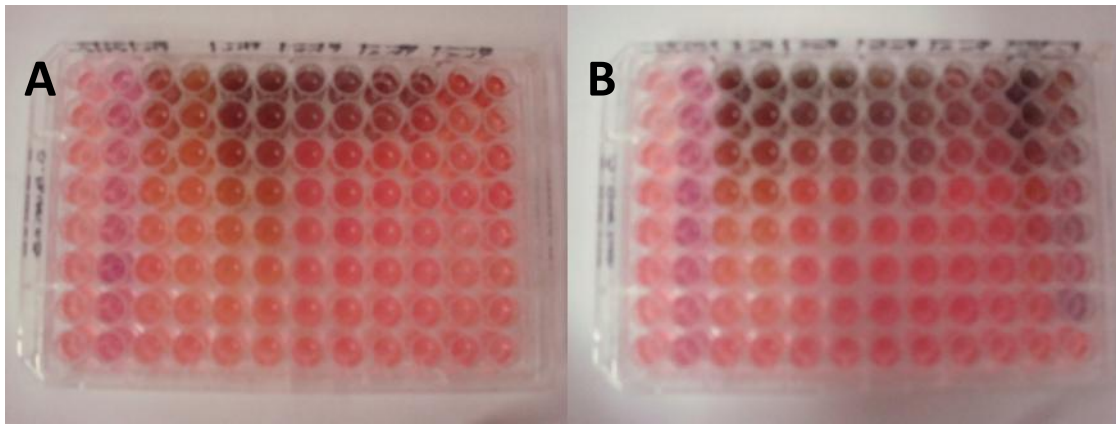


Imagen 8. Ensayos realizados con *Staphylococcus aureus*: A) Se observa el efecto que ejerce *Piper aduncum*. B) Como actúa *Piper hispidum* frente a ésta bacteria.

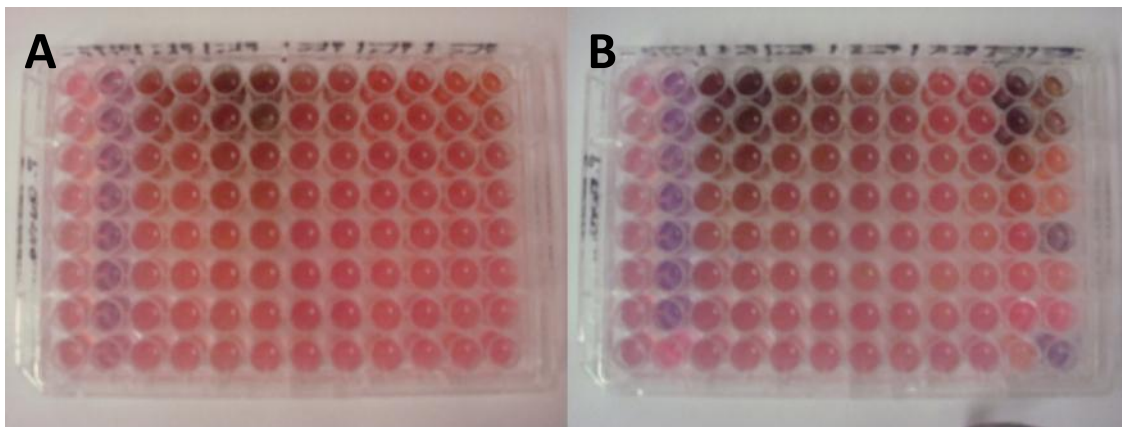


Imagen 9. Ensayos realizados con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*: A) Se observa el efecto que ejerce *Piper aduncum*, B) *Piper hispidum* frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

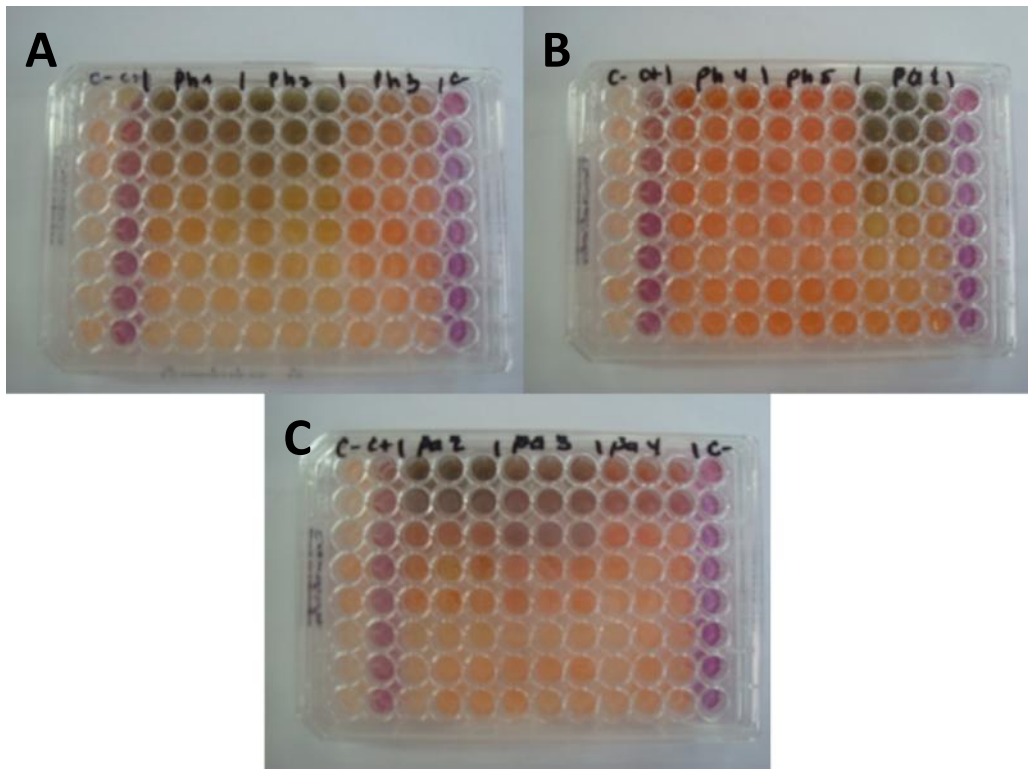


Imagen 10. Las tres fotografías muestran la actividad de las nuevas fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* evaluadas frente a *Candida albicans*.

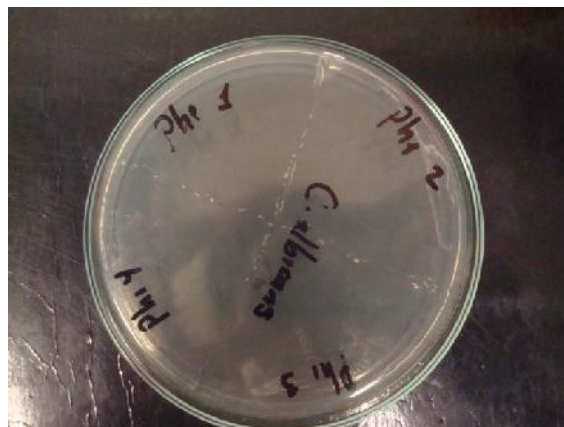


Imagen 11. Repique realizados a las cuatro primeras concentraciones de la fracción uno de *Piper hispidum* frente a *Candida albicans* en donde no se podía observar a simple vista el efecto del Resazurin, se puede observar que las dos primeras concentraciones inhibieron el crecimiento fúngico de *Candida albicans* mientras en las concentraciones tres y cuatro creció la levadura.

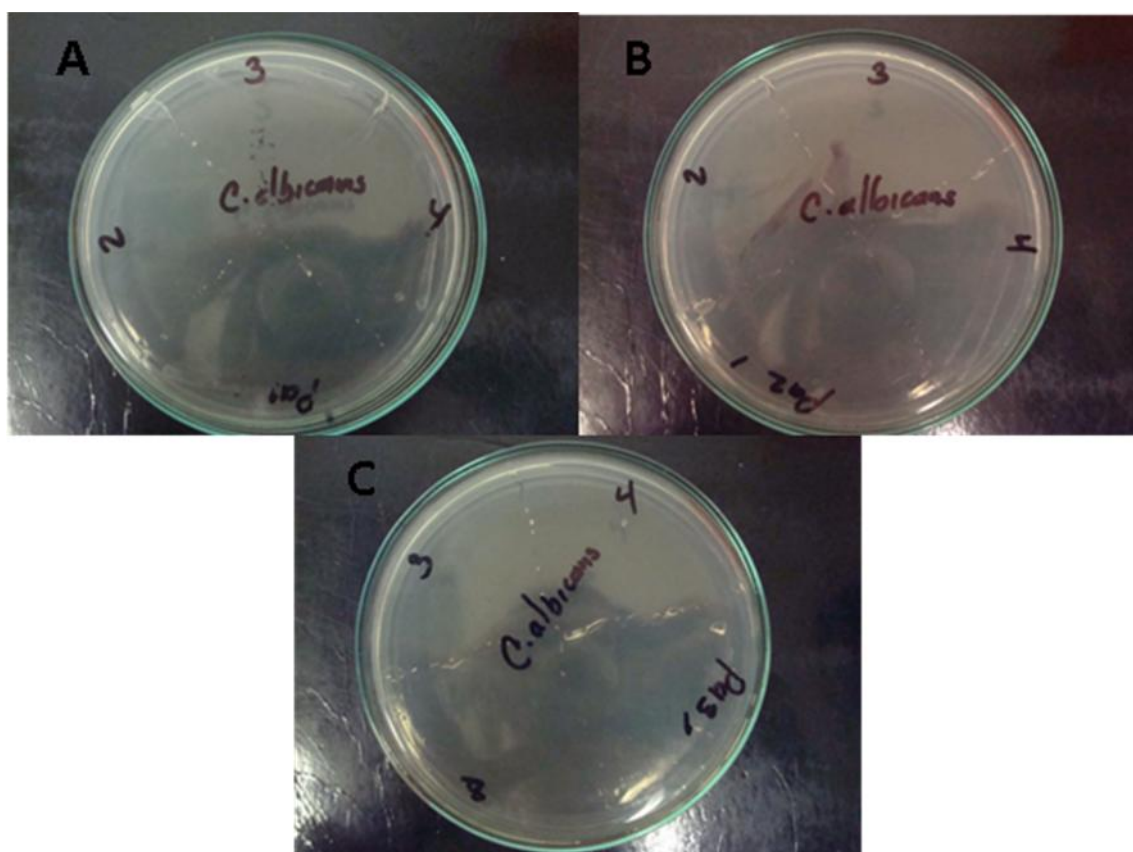


Imagen 12. Repiques realizados a las fracciones uno, dos y tres de *Piper aduncum* frente a *Candida albicans* para observar el efecto causado por las cuatro primeras concentraciones debido a que el efecto no se pudo notar con el resazurin.

9.4. Actividad Citotóxica del Extracto de *Piper aduncum* y *Piper hispidum*

La prueba de citotoxicidad realizada a las fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* arrojó que la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de cinco fracciones fueron citotóxica con valores de 4,2; 3,8; 2,2; 4,5 y 10,1 µg/mL, para las fracciones dos, tres, cuatro y cinco de *Piper hispidum*, y la fracción uno de *Piper aduncum* respectivamente, además las fracciones uno de *Piper hispidum* y dos, tres y cuatro de *Piper aduncum* tuvieron una mediana toxicidad, siendo las menos tóxicas las fracción dos y cuatro de *Piper aduncum* con valores de 46,1 y 58,1 µg/mL respectivamente, lo que indica que estos extractos son menos tóxicos para las células U-937 debido a que al hacer la lectura de los platos de 96 pozos que contenían las muestra, el lector de ELISA detectó que hubo menos mortalidad de células con estos extractos, e inclusive la concentración letal de estas muestras están por encima de la dosis letal del control positivo utilizado (Anfotericina B), (ver Tabla 5).

Tabla 5. Prueba de Citotoxicidad realizada a las fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum*.

Nombre del producto	Tipo producto	CL ₅₀ (µg/ml) X ± SD
		U-937
F1 <i>Piper hispidum</i>	Extractos	31.5 ± 3.0
F2 <i>Piper hispidum</i>	Extractos	4.2 ± 0.04
F3 <i>Piper hispidum</i>	Extractos	3.8 ± 0.1
F4 <i>Piper hispidum</i>	Extractos	2.2 ± 0.5
F5 <i>Piper hispidum</i>	Extractos	4.5 ± 0.06
F1 <i>Piper aduncum</i>	Extractos	10.1 ± 0.02
F2 <i>Piper aduncum</i>	Extractos	46.1 ± 17.9
F3 <i>Piper aduncum</i>	Extractos	38.8 ± 0.4
F4 <i>Piper aduncum</i>	Extractos	58.1 ± 0.5
Anfotericina B®	Medicamento	36.6 ± 8.0

10. DISCUSIÓN

Los análisis RMN arrojaron en las especies de *Piper hispidum* y *Piper aduncum* la posible presencia de grupos metoxi, metilo y anillos aromáticos, y para el caso particular de *Piper hispidum* la presencia de ácidos carboxílicos y grupos arílicos, estos mismo metabolomas se reportan en otros estudios con especies de *Piper* como terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), quinolonas (Morandim-Giannetti *et al.* 2010) propenoyl, pyrrolidine y piperamina (Navickiene *et al.* 2000) alcaloides, amidas (piperidina y aduncumina), pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos (Palacios *et al.* 2009), además de la presencia de chalconas y Fenilpropanoides (Ruiz *et al.* 2011, Araújo *et al.* 2012), terpineol y piperitona (Potzemheim *et al.* 2012).

En las pruebas realizadas para determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de las fracciones extraídas con Acetato de Etilo, se encontró que éstas no presentaban ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*), por el contrario, Baldoqui *et al.* (1999) reportó actividad inhibitoria en *S. aureus* (bacteria Gram +) por parte del Eupomatinoide-5, que fue extraído y aislado de las hojas de *Piper aduncum* con etanol-agua, resultados similares obtuvieron Lemos *et al.* (2000) que realizaron la extracción de las hojas de *Piper aduncum* con Cloroformo, Hexano, Acetato de Etilo, metanol y agua, encontrando actividad antibacteriana sobre *S. aureus* con los extractos crudos de cloroformo y hexano, siendo más eficiente el primero con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 459 µg/mL y el segundo de 2.875 µg/mL, los resultados obtenidos por Lemos *et al.* (2000) y los mostrados en el presente estudio evidencian la poca eficiencia de los extractos de Acetato de Etilo en la actividad antibacteriana, los resultados pueden ser inocuos para las cepas bacterianas debido a la forma de obtención de los extractos a partir de la mezcla hojas, tallos y frutos, y que el solvente utilizado para este estudio fue diferente al de los autores mencionados.

Para tres fracciones de *Piper aduncum* y una de *Piper hispidum* se obtuvo actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las fracciones uno, dos, y tres de *Piper aduncum* de 2.500, 1.250 y 625 µg/mL respectivamente y para la fracción uno de *Piper hispidum* fue de 2.500 µg/mL, al contrastar estos resultados con lo reportado por Morandim-Giannetti *et al.* (2010) quienes encontraron actividad antifúngica sobre *Candida albicans* de aceites esenciales extraídos por hidrodestilación de las hojas de

Piper aduncum con CMI 250 µg/mL pero una mayor actividad sobre *Candida neoformans* con una CMI de 62,50 µg/mL, probablemente la diferencia encontrada en las CMI de las fracciones sobre la actividad antifúngica de *Candida albicans* se deba a que se extrajeron compuestos distintos (metabolitos secundarios y aceites esenciales) y al método de extracción utilizada en cada caso.

Morandim-Giannetti *et al.* (2010) establecen rangos de la efectividad de los compuestos antifúngicos: 50–500 µg/mL la actividad de fuerte, de 600–1.500 µg/mL es moderada y de 1.500 µg/mL débil y Basilio *Et al.* (2010) proponen rangos de la efectividad de los compuestos antibacterianos: 100 µg/mL buena actividad, 100–500 µg/mL moderada, 500–1.000 µg/mL débil y 1.000 inactiva. Sin embargo para identificar la efectividad de la CMI de los extractos estudiados se tuvo en cuenta lo establecido por Morandim-Giannetti *et al.* (2010) ya que utilizaron el mismo método de Microdiluciones y cepas ATCC 90028 de *Candida albicans* en la actividad antifúngica, en este orden de ideas las fracciones dos y tres de *Piper aduncum* se encuentran dentro de la actividad antifúngica “moderada” y la fracción uno de *Piper aduncum* y uno de *Piper hispidum* se encuentran dentro la categoría “débiles”, sin embargo el método de extracción no fue el mismo para ambos estudios probablemente los metabolitos y aceites esenciales que ejercen esta actividad sean diferentes, por lo tanto se recomienda que se realicen estudios específicos para determinar que compuestos componen los extractos por este estudio.

La prueba de citotoxicidad realizada a las fracciones de *Piper aduncum* y *Piper hispidum* arrojó que la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de las fracciones cuatro, tres, dos y cinco de *Piper hispidum* (2,2±0,5; 3,8±0,1; 4,2±0,04 y 4,5±0,06 µg/mL respectivamente) y para las fracción uno *Piper aduncum* (10,1±0,02 µg/mL) mostraron valores por debajo del control positivo (Anfotericina B, con 36.6±8,0 µg/mL) lo que indica que son toxicas, sin embargo la CL₅₀ de la fracción dos (46,1±17,9 µg/mL), indica que podría oscilar entre valores tóxicos (28,2 µg/mL) y levemente tóxicos (64 µg/mL), y la fracción cuatro de *Piper aduncum* (58,1±0,5 µg/mL) no oscilaría en forma significativa manteniéndose en valores levemente tóxicos

A pesar que algunas fracciones presentaron una CL₅₀ inferiores a la del control positivo en las pruebas Citotóxicas, estas no presentaron ninguna actividad antibacteriana lo que

podría deberse a que los compuestos presentes en las fracciones evaluadas no ejercieron daño a la composición química de las células procariotas, como posiblemente lo hicieron en células eucariota (hongos y U937). Según las recomendaciones del NCI (National Cancer Institute, EE.UU.) para considerar un extracto crudo “prometedor” para una mejor purificación, los valores CL_{50} deben ser inferiores a $30\mu\text{g/mL}$, para descubrir y desarrollar potenciales compuestos naturales contra el cáncer, con concentraciones crecientes que van desde $1\mu\text{g/mL}$ a $50\mu\text{g/mL}$ de extractos crudos (Belayachi *et al.* 2013), los resultados obtenidos por este estudio muestran la relevancia que tendría realizar estudios en células cancerígenas con los extractos obtenidos de *Piper aduncum* y *Piper hispidum*.

11. CONCLUSIONES

Los extractos crudos en acetato de etilo de *Piper hispidum* y *Piper aduncum* utilizados en éste trabajo fueron inocuos frente a la actividad bacteriana en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo algunas de las fracciones presentaron efecto antifúngico sobre *Candida albicans* inhibiendo por completo el crecimiento de esta levadura en concentraciones de 5.000; 2.500; 1.250 y 625 µg/mL esto indica que cuatro de los extractos crudos obtenidos de estas plantas por el método utilizado pueden presentar potencialidad contra cepas de *Candida albicans* y hongos similares a ésta especie.

Se deben realizar estudios fitoquímicos que identifiquen los metabolitos secundarios u otros compuestos que son el principio activo y que provocan tales efectos antifúngicos.

Las fracciones de *Piper hispidum* presentaron una mayor toxicidad con valores de 2,2; 3,8; 4,2 y 4,5 µg/mL, mientras sólo una fracción de *Piper aduncum* lo hizo, con valores de 10,1 µg/mL, destacando el hecho de que el valor más bajo de *Piper aduncum* (10,1 µg/mL) pasa del doble del valor más alto de *Piper hispidum* (4,5 µg/mL), esto sugiere que *Piper hispidum* es más toxico que *Piper aduncum*.

12. RECOMENDACIONES

La realización de estudios fitoquímicos que promuevan la identificación específica de los metabolitos presentes en las dos especies de plantas utilizadas *Piper hispidum* y *Piper aduncum*.

Elaborar ensayos con extractos purificados de *Piper hispidum* y *Piper aduncum* y evaluarlos contra cepas bacterianas con el objetivo de observar si purificando los extractos siguen teniendo el mismo efecto inocuo.

La utilización de otras metodologías de extracción que permitan verificar la efectividad de los extractos puros de *Piper aduncum* y *Piper hispidum*.

Evaluar las fracciones con alta toxicidad en células cancerosas para probar efecto inhibitorio en este tipo de células.

13. BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO MJC, CÂMARA CAG, BORN FS, MORAES MM, BADJI CA. 2012. **Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*.** ExpApplAcarol 57:139–155.
- BALDOQUI DC, KATO MJ, CAVALHEIRO AJ, BOLZANI VS, YOUNG MCM, FURLAN M. 1999. **A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*.** Phytochemistry 51: 899–902.
- BARRANCO W. 2011. **Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la sierra nevada de santa marta: inventario etnobotánica y evaluación biológica.** Tesis de Maestría. Medellín, Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 45p.
- BASILIO F, APARICIO D, UEDA-NAKAMURA T, VATURU C, PRADO B. 2010. **Activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** Molecules 15: 2060-2069.
- BECERRA G, CARRILLO G, PLASCENCIA A, RIVERA C, VELARDE F, DOMÍNGUEZ M, HERNÁNDEZ I. 2008. **Determinación de sensibilidad y CMI de caspofungina en cepas multirresistentes de *Candida albicans* y *Candida atropicalis* mediante la técnica de microdilución.** ENF INF MICROBIOL 28 (4): 142-144.
- BELAYACHI L, ACEVES-LUQUERO C, MERGHOUB N, BAKRI Y, FERNANDEZ S, AMZAZI S, VILLALONGA P. 2013. **Screening of north African medicinal plant extracts for cytotoxic activity against tumor cell lines.** European journal of Medicinal Plants 3(3): 310-332.
- BORROTO J, TRUJILLO R, DE LA TORRE Y, WASMAN N, HERNANDEZ M, SALAZAR R. 2011. **Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L.** Revista Cubana de Plantas Medicinales. 16(1): 34-42.

- CALDERÓN, E., G. GALEANO & N. GARCÍA (eds.). 2002. **Libro Rojo de Plantas Fanerógamas de Colombia. Volumen 1: Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae y Lecythidaceae. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia.** Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente.
- CARREÑO J, GAONA M, PEÑA M, RIOS D, REVERA C. 2006. **Infecciones recurrentes por *Staphylococcus aureus* en pacientes con *piercing* nasal asociado al estado de portador: Estudio de caso.** Revista ciencias de la salud 4(002): 116-122.
- CASTRO W, DE SOUZA JR, MENEZES HE, HEINZEN H, CESIO MV, MATO M, ALBRECHT F, DE AZEVEDO J, MONTEIRO N. 2009. **Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** Veterinary Parasitology 164: 267–274.
- CHITNIS R, ABICHANDANI M, NIGAM P, NAHAR L, SARKER SD. 2007. **Actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Piper Cubeba* (Piperaceae).** ArsPharm. 48(4): 343-350.
- DYLER LA, PALMER A. (eds.). 2004 ***Piper: A model genus for studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution.*** New York, United States. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 214p.
- FLORES E. 2006. **Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana.** Tesis doctoral. Universidad de la Laguna. Tenerife, España. 362p.
- FLORES N, JIMÉNEZ IA, GIMÉNEZ A, RUIZ G, GUTIÉRREZ D, BOURDY G, BAZZOCCHI IL. 2009. **Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species.** Phytochemistry 70: 621–627.
- GALLEGO A, TORRES F, ROBLEDO S, VÉLEZ I, CARRILLO L, MUÑOZ D, QUIÑONES W, FONNEGRA R, ROLDÁN J, VALENCIA L, TRIANA O, ECHEVERRI F. 2006.

Actividad leishmanicida y tripanocida de *Acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, *P. Subpedale*, *Sphagnumre curvum* y *Vismiabaccifera ferruginea*. Actual. Biol. 28(84): 39-49.

GUERRINI A, SACCHETTI G, ROSSI D, PAGANETTO G, MUZZOLI M, ANDREOTTI E, TOGNOLINI M, MALDONADO ME, BRUNI R. 2009. **Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador.** Environmental Toxicology and Pharmacology 27: 39-48.

JIMÉNEZ JF, BROSETA E, GOBERNADO M. 2002. **Infección Urinaria.** Actas Actas Urol Esp. 26 (7): 563-573.

LAGO JHG, CHEN A, YOUNG MCM, GUIMARÃES EF, OLIVEIRA A, KATO MJ. 2009. **Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae).** Phytochemistry Letters. (2): 96-98.

LE MOS GCS, OLIVEIRA LO, EBERLI BB, MOTTA OV, FOLLY MM. 2000. **Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) and jaborandi-falso (*Piper aduncum* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis.** REV.BRAS.PL.MED. 3(1): 67-72.

MESA A, TORO J, CARDONA F, BLAIR S. 2012. **Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y aromáticas 11(2): 154-162.

MOLINA L, GOMEZ M, CASTAÑO J. 2011. **Contribución al estudio fotoquímico de la especie “*Sansevieria trifasciata* Prain” y su comportamiento frente a ensayos Biológicos.** Rev. Invest. Univ. Quindío (22): 121- 128.

MORANDIM-GIANNETTI AA, RINGIS A, SANTO PIETRO NA, DE OLIVEIRA HC, MENDES-GIANNINI MJS, ALECIO AC, KATO MJ, DE OLIVEIRA JE, FURLAN M. 2010. **Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils**

from leaves of Piper and Peperomia species. Journal of Medicinal Plants Research 4(17): 1810-1814.

NAVICKIENE HMD, ALÉCIO AC, KATO MJ, BOLZANI VS, YOUNG MCM, CARVALHEIRO AJ, FURLAN M. 2000. **Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*.** Phytochemistry 55: 621-626.

NEWMAN D, CRAGG G, SNADER K. 1999. **The influence of products upon drug discovery.** Nat. Prod. Rep. 17: 215-234.

NEWMAN D, CRAGG G, SNADER K. 2003. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002.** Journal of natural products 66: 1022-1037.

ORJALA J, WRIGHT AD, BEHREND S H, FOLKERS G, STICHER O, RÜEGGER H, RALI T. 1994. **Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from *Piper aduncum*.** Journal of natural products 57(1): 18–26.

OSTOS O, CIFUENTES Y, HERNANDEZ R, MUÑOZ L. 2006. **Neumonía nosocomial.** Colombia Nova. 4(6): 94-99.

PALACIOS N, BURTIN D, LEECH M. 2004. **Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. Ejemplo práctico en las plantas Colombianas de interés medicinal.** Revista Colombiana de Biotecnología 6(002): 67-77.

PALACIOS Z, DELGADO G, MORENO M, KATO M, ROJAS C. 2009. **Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Piper tuberculatum*.** Revista peruana de biología. 16 (2): 209-214.

PANIAGUA G, MONROY E, PINEDA J, NEGRETE E, VACA S.2010. **Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos.** Rev.Med.Hosp. Gen. Mex. 73(2): 94-101.

- PARRA J, DELGADO W, CUCA L. 2011. **Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense Kunth***. Phytochemistry Letters (4): 280-282.
- PIMENTEL B, REYNOLDS M. 2007. **Candidiasis vaginal**. Revista paceña de medicina familiar 4(6): 121-127.
- PINO N. 2008. **Actividad antibacteriana partir de extractos de hojas de seis especies de Genero *Piper L.* (Piperaceae)**. Revista institucional universidad tecnológica del choco: Investigación Biodiversidad y desarrollo 27(1): 67-75.
- PINO O, SANCHEZ Y, RODRIGUEZ H, CORREA TM, DEMEDIO J, SANABRIA JL. 2011. **Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum subsp. Ossanum* Frente a *Varroa destructor***. Revista de Protección Vegetal 26(1): 52-61.
- PLAZAS E, CUCA L, DELGADO W. 2008. **Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum Kunth* (Piperaceae) y derivados acetilados**. Revista Colombiana de química 37(2): 135-144.
- POTZERNHEIM MCL, BIZZO HR, SILVA JP, VIEIRA RF. 2012. **Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum L.* from Distrito Federal, Brazil**. Biochemical Systematics and Ecology 42: 25–31.
- PORTET B, FABRE N, ROUMY V, GORNITZKA B, BOURDY G, CHEVALLEY V, SAUVAIN M, VALENTIN A, MOULIS C. 2007. **Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense***. Phytochemistry 68: 1312–1320.
- RALI T, WOSSA SW, LEACH DN, WATERMAN PG. 2007. **Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum L* and *Piper gibbilimum C. DC* (Piperaceae) from Papua New Guinea**. Molecules 12: 389-394.
- RIVERA D. 2008. **Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de**

tres especies del género *piper* y evaluación de la actividad citotóxica. Tesis Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia. Guatemala. 58p.

RUDDOCK P, CHARLAND M, RAMIREZ S, LOPEZ A, TOWERS N, ARNASON J, LIAO M, DILLON J. 2011. **Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*.** Sexually Transmitted Diseases 38(2): 82-88.

RUIZ J, ROQUE A. 2009. **Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente Peruano.** Ciencias e Investigación 12(1): 41-47.

RUIZ C, HADDAD M, ALBAN J, BOURDY G, REATEGUI R, CASTILLO D, SAUVAIN M, DEHARO E, ESTEVEZ Y, AREVALO J, ROJAS R. 2011. **Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *piper hispidum*.** Phytochemistry letters 4: 363-366.

SARKER S, NAHAR L, KUMARASAMY Y. 2007. **Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals.** Methods 42(4): 321–324.

14. ANEXOS

Anexo 1. Equipo de Soxhlet al cual fueron sometidas las muestras de plantas durante ocho horas.



Anexo 2. Proceso de percolación en el que se sometieron las muestras secas y molidas de las especies de *Piper hispidum* y de *Piper aduncum* durante 48 horas cada una.



Anexo 3. Fotografía del Rota-evaporador en el cual se extraía el solvente de cada uno de los extractos después de cada proceso.



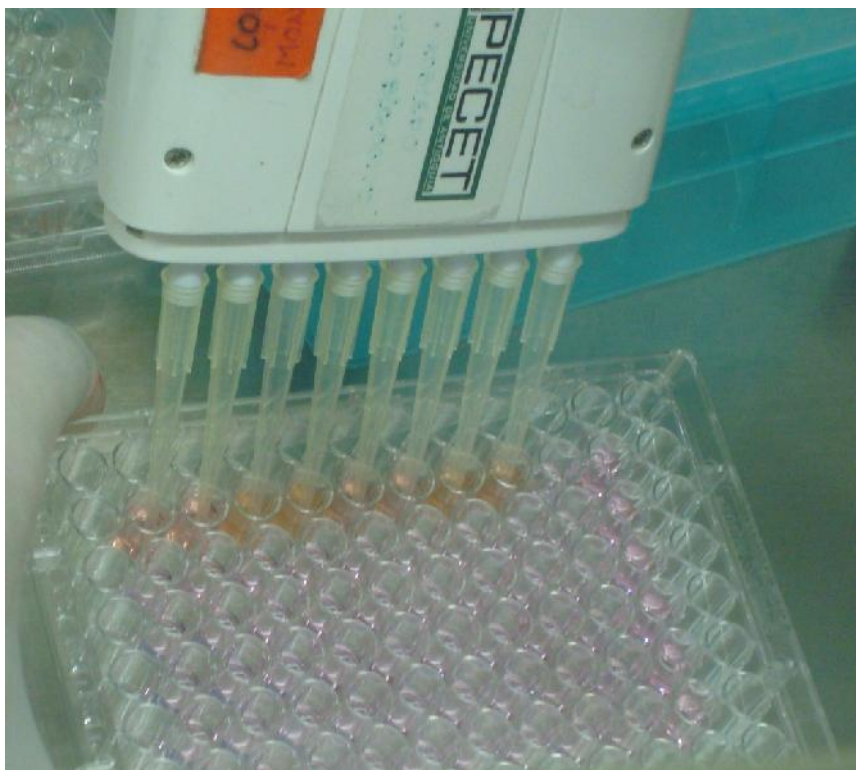
Anexo 4. Embudo de separación en el cual se le realizó el lavado de las muestras con acetato de etilo para extraer metabolitos presentes.



Anexo 5. Columna de sephadex al que fueron sometidas cada uno de los extractos de acetato de etilo con cada una de las especies de *Piper* trabajada con el objeto de separar en fracciones dependiendo de su polaridad.



Anexo 6. Imagen del ensayo de citotoxicidad aplicada a los extractos obtenidos de *Piper hispidum* y *Piper aduncum*.



Anexo 7. Fotografía del montaje de extractos para las pruebas de citotoxicidad de *Piper hispidum* y *Piper aduncum*.

